

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-241307

(43)Date of publication of application : 28.08.2002

(51)Int.Cl. A61K 45/00
A61K 31/41
A61K 33/44
A61K 47/48
A61P 1/16
A61P 9/10
A61P 9/14
A61P 11/00
A61P 13/12
A61P 31/00
A61P 31/12
A61P 35/00
A61P 43/00

(21)Application number : 2001-041674

(71)Applicant : TABATA YASUHIKO

MITSUBISHI CORP

HONJO CHEMICAL CORP

(22)Date of filing : 19.02.2001

(72)Inventor : TABATA YASUHIKO

(54) ACTIVE OXYGEN GENERATING AGENT FOR ULTRASONIC THERAPY CONTAINING PHOTSENSITIZER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an active oxygen generating agent for ultrasonic therapy usable in treating cancer at a depth of body, viral infectious diseases intracellularly parasitic infectious diseases, pulmonary fibrosis, hepatocirrhosis, chronic nephritis, arteriosclerosis and angiostenosis each impossible to irradiate lesions with light, because of enabling the photosensitizer such as fullerene contained therein to generate active oxygen even at a depth of the body.

SOLUTION: This active oxygen generating agent for ultrasonic therapy contains a photosensitizer.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

Best Available Copy

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-241307
(P2002-241307A)

(43) 公開日 平成14年8月28日 (2002.8.28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
31/41		31/41	4 C 0 8 4
33/44		33/44	4 C 0 8 6
47/48		47/48	
A 6 1 P 1/16		A 6 1 P 1/16	
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-41674 (P2001-41674)	(71) 出願人	599029420 田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
(22) 出願日	平成13年2月19日 (2001.2.19)	(71) 出願人	000005979 三菱商事株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目6番3号
		(71) 出願人	000243320 本荘ケミカル株式会社 大阪府大阪市淀川区宮原3丁目5番24号
		(72) 発明者	田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
		(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇 (外1名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 光増感剤を含有する超音波治療用活性酸素発生剤

(57) 【要約】

【課題】 身体の深部においてもフラレーンなどの光増感剤に活性酸素を発生させることができるため、光照射が不可能な身体深部のがん、ウィルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、及び血管狭窄病変の治療にも用いることができる超音波治療用活性酸素発生剤を提供する。

【解決手段】 光増感剤を含有する超音波治療用活性酸素発生剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 光増感剤を含有する超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項2】 光増感剤が、水溶性高分子と複合化したフラーレンである、請求項1記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項3】 フラーレンが、 C_{60} フラーレン又はナノチューブフラーレンである、請求項2記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項4】 水溶性高分子が、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような非イオン性水溶性合成高分子；デキストラン；プルラン；デンブ、ヒドロキシエチルデンブ及びヒドロキシプロピルデンブのようなデンブ誘導体を含む非イオン性水溶性高分子；アルギン酸；ヒアルロン酸；キトサン；キチン誘導体；並びにこれらの高分子のアニオン性又はカチオン性誘導体及びこれらの高分子の2成分又は3成分の共重合体から選択される、請求項2又は3記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項5】 水溶性高分子が、官能基を介してフラーレンと複合化している、請求項2～4のいずれか1項記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項6】 官能基が、アミノ基である、請求項5記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項7】 光増感剤が、ホルフィリン誘導体である、請求項1記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項8】 ホルフィリン誘導体が、水溶性高分子と結合している、請求項7記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項9】 水溶性高分子が、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような非イオン性水溶性合成高分子；デキストラン；プルラン；デンブ、ヒドロキシエチルデンブ及びヒドロキシプロピルデンブのようなデンブ誘導体を含む非イオン性水溶性高分子；アルギン酸；ヒアルロン酸；キトサン；キチン誘導体；並びにこれらの高分子のアニオン性又はカチオン性誘導体及びこれらの高分子の2成分又は3成分の共重合体から選択される、請求項8記載の超音波治療用活性酸素発生剤。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか1項記載の超音波治療用活性酸素発生剤を含有する、がん、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、及び血管狭窄病変の治療剤。

【請求項11】 請求項1～9のいずれか1項記載の超音波治療用活性酸素発生剤及び薬学的に許容しうる担体を含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、超音波を照射することによってフラーレン及びホルフィリン誘導体などの光増感剤に活性酸素を発生させる、光増感剤を含有する超音波治療用活性酸素発生剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 一重項酸素などの活性酸素は、反応性に富み、細胞のDNAを切断し、細胞増殖を抑制し、タンパク質分解酵素の活性を阻害するなどの細胞毒性を示すことから、がん、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、及び血管狭窄病変などの各種疾患における効果が期待されている。このような活性酸素は、各種光増感剤に可視光を照射することにより発生することが知られており、このような光増感剤としては、フラーレン、ホルフィリン誘導体などがある。しかしこれらの光増感剤に活性酸素を発生させるには、光照射が必須であるため、上記のような疾患においても、光照射が可能な部位における疾患（例えば、皮膚がん、気管がん、食道上皮がんのような体及び粘膜表面のがん）にその適用が限られていた。例えば上述の他の疾病に対しても、その病巣が臓器組織の内部に位置していることから光照射が有効ではなかった。そのため、光照射が不可能な身体深部の疾患においても光増感剤に活性酸素を発生させることができる光増感剤含有活性酸素発生剤の開発が求められていた。

【0003】 また光増感剤の一つであるフラーレンに関しては、 C_n （炭素）クラスターの総称であり、 n の数に応じて C_{60} 、 C_{70} などの純炭素物質、又は金属（もしくは金属酸化物）を内包した炭素クラスターなどの化合物があることが知られている（化学、50(6)、1995を参照）。フラーレン自体は、水不溶性であるため、生体内への投与が困難である。一方、がん組織には、正常組織と比べてその組織構造の違いから、高分子物質が移行しやすく、またがん組織に長く滞留する傾向がある。このため生体内への投与を可能とするように水溶性を付与するとともに、がん組織に特異的に移行し、滞留する特性を付与することによって、正常組織が活性酸素の細胞毒性を被ることによる副作用を軽減するために、各種水溶性高分子をフラーレンと結合させることが検討されている。このような水溶性高分子としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、デキストラン、プルラン、デンブ誘導体、及びこれらの高分子の誘導体を用いることが提案されている（BIO INDUSTRY, Vol. 14, No. 7, pages 30-37, 1997、特開平9-235235号を参照）。

【0004】 一方、超音波照射に関しては、液体に超音波を照射すると、液体内部に泡が生成（cavitation）し、この生成した泡が壊れる際に、局所的に熱、圧力などが発生する。これによりラジカル（ $\cdot OH$ など）が発生し、このラジカルが、励起状態から基底状態に移移したり、再結合する際に、主として300～600nmの波

長範囲を有する光が出る（この現象は、ソノルミネッセンスと称される）ことが知られている（"Sonochemistry", K.S. Suslick, Science, Vol. 247, pages 1439-1445, 1990を参照）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上述したように、光照射が不可能な身体深部の疾患においてもフラレーンなどの各種光増感剤に活性酸素を発生させることができる光増感剤含有活性酸素発生剤のシステムの開発が求められていた。本発明者らは、このようなシステムを開発するために鋭意研究を行った結果、生体に光増感剤を投与後、生体に超音波照射を行なうと、ソノルミネッセンスにより生じた主として300～600nmの波長範囲を有する光によって光増感剤が活性酸素を発生することを発見し、本発明を完成させるに至った。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、水溶性高分子と複合化したフラレーンなどの光増感剤を含有する、超音波治療用活性酸素発生剤に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】上述したように、本発明の超音波治療用活性酸素発生剤は、超音波を照射した際に生じるソノルミネッセンス（光生成現象）を利用して、生体内において光増感剤に活性酸素を発生させ、それによってがん、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、及び血管狭窄病変などの病巣の細胞を破壊させるというものである。

【0008】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤に含有される光増感剤としては、ソノルミネッセンスにより活性酸素を発生することができる光増感剤であればいかなる光増感剤をも使用することができ、具体的には、水溶性高分子と複合化したフラレーン及び各種ポルフィリン誘導体のほか、従来光増感剤として使用されている、アクリジン、ローズベンガル、アクリジンオレンジ、硫酸ベルベリン、フルオレセイン、テトラサイクリン、エオシンY、NTS、アソラレン、ボネリン、フェオフォルミド、クロリンe6、メソテトラ（ヒドロキシフェニル）クロリン、フタロシアニン、アルブリン、5-アミノラエブリン酸（ALA）、HAT-D01（マグネシウム 塩素-塩素二量体）など各種の光増感剤を挙げることができる。ポルフィリン誘導体としては、ポルフィマーナトリウム（フォトフリン（登録商標））、ヘマトポルフィリン、メタロポルフィリン、硫酸テトラフェニルポルフィリン、プロトポルフィリン、ウロポルフィリン、コプロポルフィリン、ジヘマトポルフィリンエーテル（DHE）、ベンゾポルフィリン（BPS）、ATX-70（ガリウム-プロフィリン錯体）、ATX-S10（four-formyloximethylidene-3-hydroxy-2-vinyl-deuterio porphyrinyl (IX)-6-7-bisaspatic acid）などを挙げることができる。各種ポルフィリン誘導体のなかで

も、特にポルフィマーナトリウムを好ましく使用することができる。

【0009】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤に含有される光増感剤の一つである水溶性高分子と複合化したフラレーンとは、本来水に不溶性であるフラレーンを、水溶性高分子と化学結合、又は分子間力による物理的結合により複合化したものであり、水溶性高分子と複合化させることによって水溶性を付与されている。このフラレーンとしては、その種類で特に限定されるものではなく、活性酸素を発生するものであればいかなる種類のものも使用しうが、 $n=60$ の純炭素物質 C_{60} フラレーン、 C_{70} フラレーン、やはり純炭素物質であるナノチューブフラレーン、そして各種高次フラレーンなどを用いることができる。なかでも供給及び取り扱いの容易さの点から、ナノチューブ及び C_{60} フラレーンを用いるのが好ましい。特に、従来の炭素線維よりも細く、ほぼ完全にグラファイト化し（グラファイトの各層が入り子構造的に積層している）、先端部は五員環が入ることにより閉じており、それぞれの層は、螺旋構造を有しているナノチューブ（フラレーンの化学と物理、篠原他著、名古屋大学出版界）を好ましく使用することができる。これらの各種フラレーンは、市販されており、例えば本荘ケミカル、三菱商事、東京化成工業などから入手可能である（商品名： C_{60} フラレーン、 C_{70} フラレーン、マルチウォールナノチューブ、シングルウォールナノチューブなど）。

【0010】また、上記のフラレーンに水溶性を付与するためにフラレーンと複合化している水溶性高分子としては特に限定されるものではなく、市販されている各種水溶性高分子を使用することができる。なかでも、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような非イオン性水溶性合成高分子；デキストラン；アルラン；デンブアン、ヒドロキシエチルデンブアン及びヒドロキシプロピルデンブアンのようなデンブアン誘導体を含む非イオン性水溶性高分子；アルギン酸；ヒアルロン酸；キトサン；キチン誘導体；並びにこれらの高分子のアニオン性又はカチオン性誘導体、及びこれらの高分子の2成分又は3成分の共重合体を用いることができる。なかでもフラレーンと共通溶媒を持ち、フラレーンとの複合化反応に関与する官能基が分子末端のみにあり、化学結合様式が単純であるなどの理由から、ポリエチレングリコールを好ましく用いることができる。

【0011】これらの水溶性高分子の分子量は、特に限定されるものではないが、1,000～1,000,000のもの、好ましくは5,000～50,000のものをを用いることができる。

【0012】水溶性高分子としては、分子量1,000～1,000,000、特に5,000～15,000のポリエチレングリコールを用いるのが特に好ましい。

【0013】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤においてフラレーンと複合化させるために使用しうる水溶性高分子は、フラレーンと複合化させるための官能基を有しており、水溶性高分子は、官能基を介してフラレーンと複合化している。このような官能基としては、フラレーンとの複合化を可能とするようないかなる官能基も用いることができ、アミノ基、水酸基、シアノ基、カルボキシル基などの求核置換反応性を有する官能基を挙げることができる。なかでもアミノ基を好ましく使用することができる。例えばアミノ基を用いてフラレーンを化学結合により水溶性高分子と結合させる場合は、フラレーンの二重結合へのアミノ基の付加反応により、フラレーンが水溶性高分子と結合する。このような官能基は、フラレーンとの複合化に適した箇所であれば水溶性高分子の分子内のいかなる箇所に存在してもよいが、複合化のしやすさを考慮して、水溶性高分子の末端に位置するのが好ましい。このような官能基を有しない水溶性高分子を用いる場合には、フラレーンとの複合化の前にまず官能基を導入しておくことが必要である。また、フラレーンと複合化させるために使用しうる水溶性高分子は、アミノ基などの官能基に加えて、フラレーンと反応しない官能基、なかでもメトキシのような C_{1-6} アルコキシ基を更に有しているのが望ましい。水溶性高分子の片端にアミノ基のような官能基がある場合、もう一方の末端にもフラレーンと結合する官能基が存在すると、水溶性高分子の両端がフラレーンと複合化することにより、フラレーンと水溶性高分子の集合体が生成してしまうが、このような集合体は、分子量が大きくなるために十分な水溶性を有しなくなる。したがって、フラレーンと複合化させるために使用しうる水溶性高分子は、アミノ基などの官能基に加えて、メトキシのようなフラレーンと反応しない官能基を更に有しているのが望ましい。ただし、両端にアミノ基などの官能基を有するポリエチレングリコールであっても、生成されるフラレーンと水溶性高分子の集合体が、十分な水溶性を有する場合であれば、使用することができる。

【0014】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤に含まれる増感剤の一つである水溶性高分子と結合したフラレーンの構造の一例を図1に示す。例示したのは、 C_{60} フラレーンに、片端にアミノ基を有し、もう一方の端にメトキシ基を有するポリエチレングリコールを結合させたものである。

【0015】上述したように本発明の超音波治療用活性酸素発生剤に増感剤として含まれる水溶性高分子と複合化したフラレーンは、生体への投与が可能な程度の水溶性を有していればよい。水溶性が低い場合、水溶性高分子と複合化したフラレーンは、凝集塊を形成するが、その塊の粒径は、がんなどの組織への移行と集積のし易さを考慮すると、400nm以下である必要があるため、これ以上の凝集塊を形成しない程度の水溶性を有する必要

がある。このような溶解度を達成するために必要なフラレーン：水溶性高分子の配合モル比は、用いる水溶性高分子の種類、水溶性高分子中のアミノ基などの官能基の含有率によっても異なる。例えば1分子当たり1個のアミノ基を有する分子量5,000～15,000のポリエチレングリコールを用いる場合には1：0.1～1：150の範囲であるのが好ましい。なかでも良好な水溶性を得るためには、1：50～1：150のモル比が特に好ましい。

【0016】光増感剤として水溶性高分子と化学的に結合したフラレーンを含有する本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を製造するには、遮光条件下にて、所望の溶解度を達成するのに必要なモル比のフラレーン及び官能基を有する水溶性高分子を、有機溶媒に溶解し、攪拌し、フラレーンと水溶性高分子を官能基を介して結合させることによって得ることができる。有機溶媒としては、ベンゼン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミドなど、なかでもベンゼンを好ましく用いることができる。反応温度は、約4～40℃、好ましくは約25℃であり、反応時間は、約6～48時間、好ましくは約24時間である。得られた反応生成物は、疎水性又はアフィニティクロマトグラフィーなどによる精製後、凍結乾燥することにより回収することができる。また水溶性高分子と分子間力により物理的に結合したフラレーンを含有する超音波治療用活性酸素発生剤を製造するには、所望の溶解度を達成するのに必要なモル比のフラレーン及び官能基を有する水溶性高分子を混合すればよい。この場合も混合することにより得られた凝集塊は、組織への移行のし易さなどの点から、400nm以下の粒径を有しているのが望ましい。

【0017】なお上述したように、光増感剤として水溶性高分子と複合化したフラレーンを含有する本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を製造するために使用する水溶性高分子は、フラレーンとの複合化を可能とするように、アミノ基などの官能基を有している必要がある。官能基を有しない水溶性高分子を用いる場合には、フラレーンとの複合化の前にまず官能基を導入することが必要である。例えば水酸基のみを有する水溶性高分子にアミノ基を導入するには、過ヨウ素酸酸化法、塩化シアヌル法、臭化シアン法、又はエピクロロヒドリン法などにより水溶性高分子の水酸基と、アルキルジアミン、リシン、リシンのエステル化合物のような一分子中にアミノ基を2個以上有するアミノ化合物との間に化学結合を形成させ、高分子側鎖にアミノ基を導入する。またカルボキシル基を有する水溶性高分子においては、N-ヒドロキシスクシンイミド・カルボジイミド、カルボジイミド、クロロ炭酸エチルなどを用いたカルボキシル基とアミノ化合物との間の結合反応によりアミノ基を高分子側鎖に導入する。例えばポリエチレングリコールにアミノ基を導入するには、両末端COOHを有するポリエチレ

ングリコールをpH 5.0のリン酸緩衝液(10重量%)に溶解させ、そこへ水溶性カルボジイミドをCOOHに対して3倍モル量投入し、室温で1時間攪拌することにより、カルボキシル基を活性化する。その後、エチレンジアミンをCOOHに対して10倍モル量加え、更に室温で6時間反応させる。得られた反応液を水に対して透析することにより両末端にアミノ基が導入されたポリエチレングリコールを得ることができる。また、片端にアミノ基が、もう一方の片端にメトキシ基が導入されたポリエチレングリコールは、日本油脂株式会社から入手可能である。

【0018】上記のようにして得られた光増感剤として水溶性高分子と複合化したフラーレンを含有する本発明の超音波治療用活性酸素発生剤は、フラーレンが水溶性高分子と複合化しているため、生体に投与するのに十分な水溶性を有すると共に、がん組織や炎症組織への高い移行性、滞留性を有する。

【0019】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤に含まれる光増感剤は、生体への投与を可能とする程度の水溶性を有しているが、水溶性高分子と複合化したフラーレン以外の光増感剤も、必要に応じて水溶性高分子と結合させることによって、がん組織や炎症組織への移行性、滞留性を高めることができる。この場合は、フラーレンと複合化させた水溶性高分子について例示したのと同じ各種水溶性高分子を使用することができる。これらの光増感剤は、有機化学の分野において従来使用されている方法で水溶性高分子と結合させることができる。

【0020】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤に含まれるフラーレンなどの光増感剤は、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光により水性媒体中で一重項酸素などの活性酸素を発生させることにより細胞毒性を示すため、がんを含む各種疾患の治療に使用することができる。照射する超音波は、周波数約100KHz～20MHz、特に約1～3MHzのものを好ましく使用することができる。照射は、約0.1～5Watt/cm²、なかでも約2Watt/cm²の出力で行うのが好ましい。Duty cycleは、約1～100%、好ましくは約10%である。照射時間は、用いる周波数、照射出力によっても異なるが、約5～300秒、好ましくは約30～120秒である。

【0021】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤は、活性酸素が細胞毒性を示すあらゆる種類のがん、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、及び血管狭窄病変などの治療に有効である。例えばがんとしては、肺がん、肝がん、膵がん、胃腸がん、膀胱がん、腎がん、脳腫瘍のような臓器の表層及びその内部に発生するあらゆる固形がんを挙げることができる。なかでも光照射が不可能であり従来は光線力学的治療が不可能であった身体深部のがんの治療に有効に用いることができる。その他の疾病について

は、その病巣又は感染細胞(罹患細胞)が臓器内部に位置しているため、光増感剤をその部位に適当な方法によって集積させた後、そこに外部より超音波照射することによって治療を行うことができる。

【0022】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤は、注射剤(静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、皮内など)、分散剤、流動性剤、固形粉末剤などのあらゆる剤型とすることができる。例えば注射剤とする場合には、本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を、注射剤に一般に用いられる緩衝剤、生理食塩水、保存剤、注射用蒸留水などの各種添加剤を配合して注射剤とすることができる。本発明の超音波治療用活性酸素発生剤の投与量は、投与経路、患者の年齢、性別、疾患の種類及び状態によっても異なるが、成人1日当たり約1～10mg/kgを1～数回に分けて投与することができる。

【0023】上述したように、がん組織や炎症組織には、正常組織と比較して高分子物質が移行しやすく、かつ蓄積しやすい。したがって、水溶性高分子と複合化又は結合した光増感剤を含有する本発明の超音波治療用活性酸素発生剤は、生体に投与されると、正常組織に比べてがん組織や炎症組織に集積され、正常組織におけるよりも高濃度で長くがん組織や炎症組織に滞留する。一方、正常組織においてはがん組織や炎症組織におけるよりも速やかに本超音波治療用活性酸素発生剤が排泄されるため、本超音波治療用活性酸素発生剤を生体に投与後、ある程度の時間をおけば、がん組織や炎症組織における本超音波治療用活性酸素発生剤の濃度は、正常組織における濃度よりも有意に高いものとなり、本超音波治療用活性酸素発生剤ががん組織や炎症組織に特異的に高濃度で分布することになる。したがって、本超音波治療用活性酸素発生剤を生体に投与後、ある程度の時間をおいた後に生体に超音波を照射すれば、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光により光増感剤が一重項酸素などの活性酸素を発生させることによりがん組織や炎症組織において特異的に抗がん活性や抗炎症活性が示される。一方、正常組織においては、本超音波治療用活性酸素発生剤の濃度は低くなっているため、正常組織に対する細胞毒性はがん組織や炎症組織におけるほどは高くなく、正常組織における副作用が軽減されることが期待される。

【0024】ヒトにおいて本発明の超音波治療用活性酸素発生剤の投与後、がん組織や炎症組織での光増感剤の濃度が正常組織での濃度よりも有意に高くなり、超音波照射が可能になるまでの時間は、個々の患者の治療部位における代謝の状態、光増感剤の分布の時間変化などによって異なるが、一般的には投与の約0.1～48時間後、特に約24時間後に超音波照射を行うのが好ましい。ヒトに照射するには、前述したような周波数の超音波を、前述したような出力、時間で照射する。したがって、本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を用いて治療

を行なうには、本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を、例えば注射剤の剤型で患者に投与し、約0.1～48時間後に、超音波発生装置を用いて超音波照射を行なう。投与量、及び投与／照射の頻度、回数などは、患者の年齢、体重、性別、疾患の種類及び状態などに応じて決定することができる。

【0025】また、水溶性高分子と複合化又は結合していない光増感剤を含有する本発明の超音波治療用活性酸素発生剤は、がん組織や炎症組織に特異的に移行、蓄積されるわけではないが、目標とする組織や細胞へ本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を送達する任意の方法、例えばドラッグデリバリーシステムにより特異的に送達する方法を用いることにより、目標とする組織や細胞でその細胞毒性作用を示させることが可能である。このような方法としては、目標とする組織や細胞に本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を直接注入する方法（例えば内視鏡を用いることで体内のほとんどの部位への送達が可能である）、目標とする組織や細胞に対する抗体、レクチン、細胞接着因子、糖鎖などの細胞認識因子を光増感剤に結合させた本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を投与する方法などを挙げることができる。また、本発明の超音波治療用活性酸素発生剤を生体に投与後、光増感剤に活性酸素を発生させたい箇所のみ超音波照射をすることにより、所望の箇所でのみ活性酸素を発生させて細胞毒性を示させることもできる。また、超音波をフォーカシングすることによって、細胞毒性発現部位の選択性を向上させることも可能である。

【0026】

【実施例】以下に本発明の超音波治療用活性酸素発生剤の製造方法、及びその抗がん活性について具体的に説明するが、これによって本発明の超音波治療用活性酸素発生剤が限定されるものではなく、これらの説明は、記載した光増感剤以外の光増感剤や、記載した疾患以外の疾患についても同様に適用される。

製造例1：本発明の超音波治療用活性酸素発生剤の製造
水溶性高分子として、一端にアミノ基、他端にメトキシ基を有するポリエチレングリコール（以下、PEG-NH₂と記載する）（分子量約5,000、日本油脂製）及びC₆₀フラレーン（東京化成工業製）を用いた。0.54mMC₆₀フラレーンのベンゼン溶液10mlに、0～108mMのPEG-NH₂を含むベンゼン溶液10mlを加え、遮光条件下、25℃で24時間攪拌することによってフラレーンをPEG-NH₂と結合させて、フラレーン-PEG-NH₂結合体を得た。反応終了後、反応溶液を凍結乾燥し、フラレーン濃度が0.27mMとなるようにフラレーン-PEG-NH₂結合体をベンゼンに溶解し、等量の蒸留水と混合し、25℃で48時間放置することにより、フラレーン-PEG-NH₂結合体を水で抽出し、水への移行を調べた。水への移行は、抽出前後のベンゼン溶液の500nmにおけるフラレーンの吸光

度の変化を測定することにより評価した。その結果、フラレーンに対するPEG-NH₂の比率が大きいほど、フラレーン-PEG-NH₂結合体の水への移行が大きくなることが認められた。このことより、本来水に不溶性であったフラレーンが、PEG-NH₂と結合することにより、水への溶解度が増大し、フラレーンが水可溶性となることが示された。フラレーンに対するPEG-NH₂の添加モル比が50以上の場合では、ほぼ100%のフラレーンが水相に移行しており、フラレーンの完全に近い水可溶化が達成されていた。

【0027】**試験例1：in vitro抗がん活性**

がん細胞としてRL♂1細胞（京都パスツール研究所より供与）を用い、この細胞を100mmディッシュにてRPMI1640培地（コスモ・バイオ社製、305-02-01、血清10%含有）中、5%CO₂、95%大気、37℃の培養条件下で、コンフルエントになるまで培養した。製造例1と同様の方法で製造したフラレーン-PEG-NH₂結合体を遮光下で、がん細胞の培養に用いたのと同じ組成の培地に溶解し、10μg/mlの濃度に調整後、滅菌処理した。6ウェルプレートの各ウェルに調整後のフラレーン-PEG-NH₂結合体含有培地を1mlずつ分注した。コントロールのウェルには、結合体を含まない培地のみを分注した。上記のコンフルエントになった細胞を2×10⁵細胞/mlに調整して細胞懸濁液を得、上記の各ウェルに細胞懸濁液1mlずつを分注した（この時点で各ウェルには、フラレーン-PEG-NH₂結合体が10μg、RL♂1細胞2×10⁵個、培地が2ml含まれている）。ウェル中の細胞をピペットで軽く攪拌した後、伝導ジェルを介して6ウェルプレートの底部より超音波照射装置（Williams Healthcare Systems: MODEL #6100）を用いて超音波を照射した（周波数：1MHz、出力：2Watt/cm²、照射時間60秒、Duty cycle：10%）。超音波照射後、プレートをアルミホイルで遮光し、インキュベーター（37℃、5%CO₂）内で3日間培養した。その後細胞係数装置（Cell Counting Kit：同仁化学、345-06463）を用いて生存細胞数を測定し、フラレーン-PEG-NH₂結合体を添加せず、超音波照射もしなかったコントロールに対する生存細胞数の割合を%で算出した。その結果、図5に示すように、フラレーン-PEG-NH₂結合体10μg/ウェルの存在下では、生存細胞数はコントロールに比べて20%以下であった。更にウェルに加えるフラレーン-PEG-NH₂結合体の量を1.25、2.5、5又は10μg/ml、超音波の周波数を1又は3MHz、照射時間を0～120秒で変化させて、生存細胞数を計数した。出力及びDuty cycleは変化させなかった。結果を図2～5に示す。

【0028】図2は、フラレーン-PEG-NH₂結合体をウェルに添加しない場合のRL♂1細胞の細胞生存率を示す（周波数1又は3MHz、照射時間は、白いバーで30秒、黒いバーで60秒）。1MHz、60秒の照射

で、細胞生存数は、変化していなかった。図3は、フラーレン-PEG-NH₂結合体5 μ g/ウエルを添加した場合のRL δ 1細胞の細胞生存率を示す(周波数1又は3MHz、照射時間は、白いバーで30秒、黒いバーで60秒)。1MHz、60秒の照射で、細胞生存数は、有意に低下した(30秒に対して $p < 0.05$)のが認められる。図4は、フラーレン-PEG-NH₂結合体5 μ g/ウエルを添加し、1MHzの超音波照射時間を0~120秒の間で変化させた場合の細胞生存率を示す。照射時間を長くするにつれて細胞生存率が低下するのが認められた。また照射15分から有意に細胞生存率が低下した。図5は、フラーレン-PEG-NH₂結合体の添加量を0~10 μ g/ウエルで変化させた場合の細胞生存率を示す(周波数1MHz、照射時間60秒)。フラーレン-PEG-NH₂結合体の添加量が増大するにつれて細胞生存率が低下したのが認められる。フラーレン-PEG-NH₂結合体の濃度1.25 μ g/ウエルから有意差が認められた。

【0029】試験例2: in vivo抗がん活性

担がんマウスを作成するために、マウスリンパ腫細胞(RL δ 1) 5×10^6 個をRPMI-1640培地100 μ lに懸濁し、BALB/c系マウスに尾静脈から投与した。このマウスリンパ腫細胞は、投与後約10日でマウスの肝臓に腫瘍を形成し、マウスをがん死させるモデル系である。製造例1に記載の方法でフラーレン-PEG-NH₂結合体を製造し、リンパ腫細胞の投与の24時間(日)後に、フラーレン含有量400 μ gの結合体を含む水溶液をマウスの尾静脈から投与した。投与の24時間後、皮膚に照射プローブをあてて肝臓部位に体外から60秒間超音波を照射し(周波数: 1MHz、出力: 2Watt/cm²、duty cycle: 10%)、照射後にマウスの死亡日を記録して生存率を求めた。その結果、超音波の照射によりマウスの生存率の増加が認められた。フ

C₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体によるO₂⁻発生

C ₆₀ フラーレン-PEG-NH ₂ 結合体 (μ g/ml)	超音波照射 a)	O ₂ ⁻ 発生量 (μ M)
0	照射	ND ^{b)}
0	照射せず	ND
2.5	照射	2.38 \pm 0.08 ^{c)}
2.5	照射せず	0.32 \pm 0.02

【0032】a) 照射時間: 60秒、出力: 2W/cm²、周波数: 1MHz、duty cycle: 10%

b) ND: 検出されず

c) 平均 \pm SE

*、 $p < 0.05$: 超音波照射しない場合のC₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体存在下におけるO₂⁻発生量に対して有意差あり。

【0033】試験例4: 腫瘍に対するC₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体の音波動力学的効果

RL δ 1細胞をin vivo条件に慣らすために、細胞を、

フラーレン-PEG-NH₂結合体の投与後超音波照射を行わなかったマウス群、フラーレン-PEG-NH₂結合体を投与せずに超音波照射のみを行ったマウス群、及び投与も照射も行わなかったマウス群では、リンパ腫細胞の投与約14日ですべてのマウスが死亡した。フラーレン-PEG-NH₂結合体の投与後、超音波照射を行ったマウス群では、リンパ腫細胞の投与14日後でも、照射時間に関係なくいずれの群においてもマウスは生存しており、超音波照射時間が長くなるにつれてその効果は大きくなっていると考えられた。

【0030】試験例3: 活性酸素発生試験

チトクローム法により、活性酸素(スーパーオキシドアニオン, O₂⁻)発生量を測定した。チトクロームC30 μ Mを含有するハックス液(HBSS、pH=7.4、Life Technologies Oriental, Inc., 東京)800 μ lを、製造例1で得たC₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体のHBSS溶液200 μ lと混合して、結合体の最終濃度を2.5 μ g/mlとした。この溶液に60秒間超音波照射した(出力: 2W/cm²、周波数: 1MHz、duty cycle: 10%)。25℃で5分間放置した後、溶液の吸光度を550nmで測定した。各操作は、暗所で行ない、各群毎に3回実験を行なった。C₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体の存在下及び非存在下で超音波照射を行なった後のO₂⁻発生量を、以下の表に示す。C₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体と超音波照射を行なった場合のみ、有意なO₂⁻発生が観察された。C₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体のみで超音波照射を行わなかった場合、及びC₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体の非存在下で超音波照射を行なった場合はいずれも、O₂⁻はほとんど発生しなかった。

【0031】

【表1】

6週齢のBALB/c系雌性マウス(Japan SLC、静岡)に、 5×10^6 細胞/0.2ml培地/マウスの濃度で静脈内接種した。2週間後にマウスの肝臓を採取し、肝臓に形成された節から腫瘍細胞を単離した。単離した細胞を再び同様に接種した。次に得られたRL δ 1細胞を、マウスに、0.2mlの量(5×10^6 細胞/マウス)を静脈内接種して、肝腫瘍を有するマウスを得た。腫瘍の接種の1日後、製造例1で得たC₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体を含有するPBSを、400 μ g/0.2ml/マウスの量で、腫瘍を有するマウスに静脈内

投与した。30分後、肝臓に超音波を1又は5分間照射した(出力: 2W/cm²、周波数: 1MHz、duty cycle: 20%)。超音波トランスデューサーチップを腹部の皮膚に取り付けて、超音波伝導ゲルを介して経皮的肝臓超音波照射を行なった。マウスは毎日観察して、その生存期間を記録した。対照群には、C₆₀フラーレンを含有しないポリエチレングリコールを静脈内注射した後、超音波を照射し、又は照射しなかった。また、C₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体のみを投与し、超音波照射しない実験と、まったく注射せずに超音波照射のみを行なった実験も行なった。各実験群は、6匹のマウスからなり、すべてのマウスは、通常の飼料と水を自由に摂取させたが、実験の間は暗所で飼育した。この結果を図6に示す。図6には、腫瘍を有するマウスに対するC₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体の投与とその後の超音波照射による治療効果を示す。C₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体のみを投与した場合と、超音波照射のみをおこなった場合とでは、マウスの生存期間は延長されなかった。反対に、C₆₀フラーレン-PEG-NH₂結合体を投与し、超音波照射を行なった場合では、超音波照射を肝臓に対して1分間行なった場合で、マウスの生存期間は有意に延長された。

【0034】

【発明の効果】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤

は、生体に投与された後、超音波照射されることにより一重項酸素などの活性酸素を発生するため、肺がん、肝がん、膵がん、胃腸がん、膀胱がん、腎がん、脳腫瘍などの、光照射が不可能な身体深部のがん並びにウィルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺繊維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、及び血管狭窄病変などの治療に有効に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の超音波治療用活性酸素発生剤に増感剤として含まれる水溶性高分子と結合したフラーレンの構造の一例を示す。

【図2】フラーレン-PEG-NH₂結合体をウエルに添加しない場合のRL γ 1細胞の細胞生存率を示す。

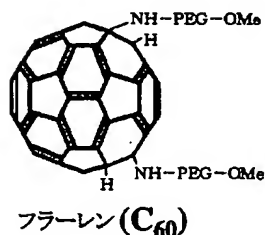
【図3】フラーレン-PEG-NH₂結合体5 μ g/ウエルを添加した場合のRL γ 1細胞の細胞生存率を示す。

【図4】フラーレン-PEG-NH₂結合体5 μ g/ウエルを添加した場合のRL γ 1細胞の細胞生存率を示す。

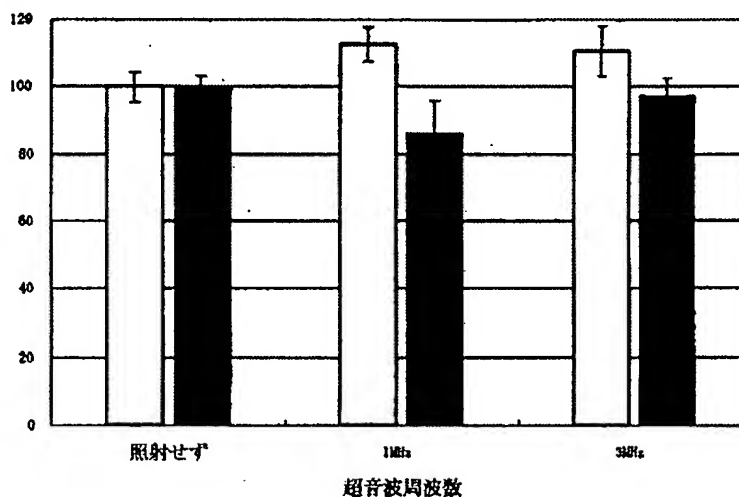
【図5】フラーレン-PEG-NH₂結合体0~10 μ g/ウエルを添加した場合のRL γ 1細胞の細胞生存率を示す。

【図6】腫瘍を有するマウスに対するフラーレン-PEG-NH₂結合体の投与とその後の超音波照射の治療効果を示す。

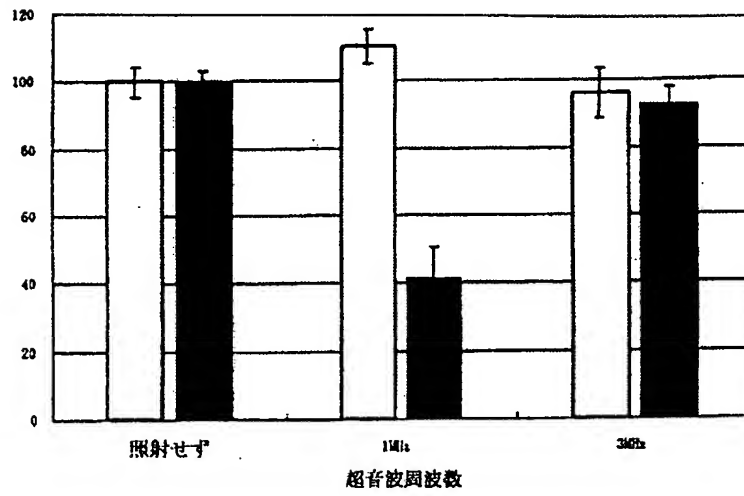
【図1】



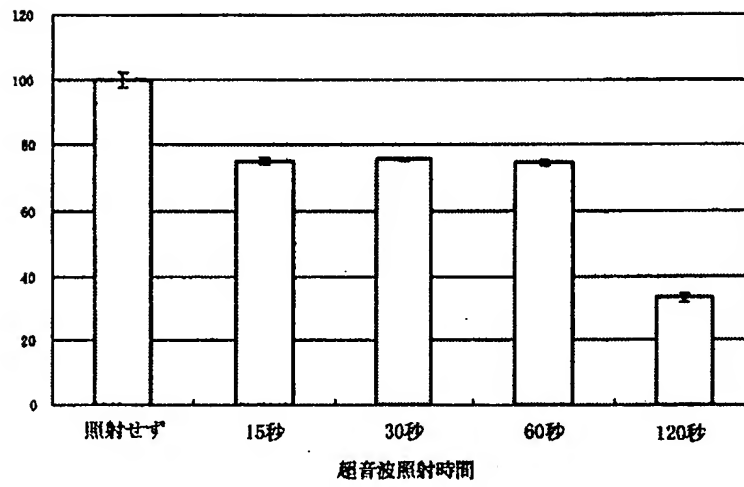
【図2】



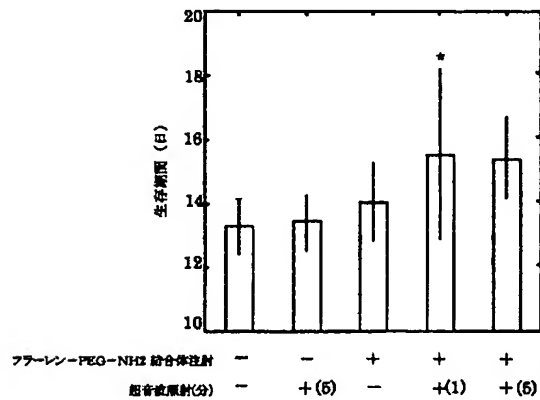
【図3】



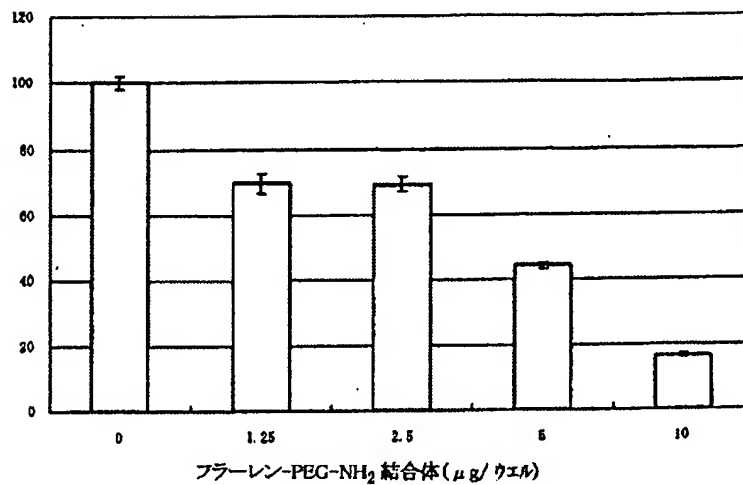
【図4】



【図6】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷		識別記号	F I		備考(参考)
A 6 1 P	9/10	1 0 1	A 6 1 P	9/10	1 0 1
	9/14			9/14	
	11/00			11/00	
	13/12			13/12	
	31/00			31/00	
	31/12			31/12	
	35/00			35/00	
	43/00	1 2 5		43/00	1 2 5

Fターム(参考) 4C076 AA12 CC11 CC15 CC16 CC17
 CC27 CC35 CC37 DD21 DD51
 EE06 EE23 EE36 EE37 EE38
 FF15
 4C084 AA02 AA17 AA18 BA31 BA32
 MA02 MA05 MA70 NA02 NA14
 ZA361 ZA362 ZA451 ZA452
 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812
 ZB261 ZB262 ZB331 ZB332
 ZB351 ZB352 ZC711 ZC712
 4C086 AA01 AA02 BC99 GA07 HA06
 HA30 MA01 MA02 MA05 NA02
 NA14 ZA44 ZA45 ZA59 ZA75
 ZA81 ZB26 ZB33 ZB35 ZC71

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.